# 结合态淀粉合成酶（Granule-bound starch synthase，GBSS）试剂盒

（微板法 96 样）

## 一、产品简介：

结合态淀粉合成酶 GBSS（EC 2.4.1.21）以束缚态存在于淀粉体中，催化淀粉链的加长反应，主要负责直链淀粉的合成。GBSS 催化 ADPG 与淀粉引物(葡聚糖)反应，将葡萄糖分子转移到淀粉引物上，同时生成 ADP，通过反应体系中添加的酶促混合物依次催化 $NADP^+$还原为 NADPH，且 NADPH 生成量与前一步反应中 ADP 生成量呈正比。

传统方法是通过检测 340nm 下 NADPH 增加量，但该法检测灵敏度低，且易受到色素（如绿色叶片）干扰，本试剂盒提供一种简单，灵敏，快速的测定方法：该酶促过程产生的 NADPH 与特异的显色探针反应生成有色物质，通过在 450nm 下检测该有色物质的增加速率，进而计算出 GBSS 酶活性大小。

## 二、试剂盒的组成和配制：

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|---|---|---|---|
| 提取液 | 液体 120mL×2 瓶 | 4℃保存 | |
| 试剂一 | 液体 60mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 试剂二 | 液体 6.5 mL×1 瓶 | 4℃保存 | **呈分散状态，用前务必摇匀，即可使用。** |
| 试剂三 | 粉体 mg×1 支 | 4℃保存 | 临用前甩几下使试剂落入底部，再加 1.1 mL 的蒸馏水溶解备用。 |
| 试剂四 | 粉体 mg×1 瓶 | 4℃保存 | 临用前甩几下使试剂落入底部，再加 6.5 mL 的试剂一溶解备用。 |
| 试剂五 | 粉体 mg×1 瓶 | 4℃保存 | 临用前甩几下使试剂落入底部，再加 17.5 mL 的试剂一溶解备用。 |
| 试剂六 | 粉体 mg×1 支 | 4℃保存 | 临用前甩几下使试剂落入底部，再加 2.2mL 蒸馏水溶解备用。 |
| 试剂七 | 液体 2.2mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 标准品 | 粉剂 mg×1 支 | -20℃保存 | 若重新做标曲，则用到该试剂。 |

## 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

## 四、结合态淀粉合成酶（GBSS）活性检测：

**建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！**

### 1、样本制备：

称取约 0.1g 组织（水分多的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃离心 10min，弃上清，在沉淀中加入 1mL 提取液充分混匀，置冰上待测。

**【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例提取**

### 2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，设定温度 25℃，调节波长至 450nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 EP 管中依次加入：

| 试剂名称（μL） | 测定管 | 对照管 |
|---|---|---|
| 样本（**悬浮液**） | 40 | 40 |
| 试剂一 | 140 | 150 |
| 试剂二（**用前务必摇匀**） | 30 | 30 |
| 试剂三 | 10 | |
| 试剂四 | 30 | 30 |
| 混匀，30℃反应 20min，沸水浴(95-100℃)2min，12000rpm， | | |

| |
|---|
| 4℃离心 10min，上清液待测。 |

③ 显色反应，在 96 孔板中依次加入：

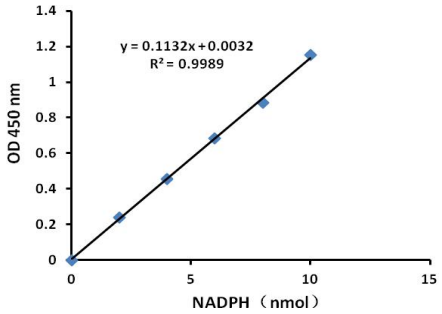
| | | |
|---|---|---|
| 上清液 | 100 | 100 |
| 试剂五 | 80 | 80 |
| 试剂六 | 10 | 10 |
| 试剂七 | 10 | 10 |
| 混匀，室温（25℃）孵育 15min，立即于 450nm 处读取吸光值。△A=A 测定-A 对照（每个样本需做一个样本自身对照）。 | | |

【注】：1.若ΔA 过小，可加大样本量 V1（如：增至 80μL，则试剂一相应减少，反应总体积不变）；或延长②步中 30℃的反应时间 T（如：延至 30min 或更长）；或增加样本取样质量 W；则调整后的 V1 和 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

2. 若 A 测定大于 1，则可在③步中对上清液用蒸馏水进行稀释，稀释倍数 D 代入公式计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程：y = 0.1132x + 0.0032，x 是 NADPH 摩尔质量：nmol，y 是ΔA。




2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

GBSS (nmol/min/mg prot)=[(ΔA-0.0032)÷0.1132×(V3÷V2)]÷(Cpr×V1) ÷T×D

=27.6×(ΔA-0.0032)÷Cpr×D

3、按照样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

GBSS(nmol/min/g 鲜重)=[(ΔA-0.0032)÷0.1132×(V3÷V2)]÷(W×V1÷V)÷T×D

=27.6×(ΔA-0.0032)÷W×D

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入样本体积，0.04mL；

V2---上清液体积，100μL； V3---反应体系总体积，250μL；

T---反应时间，20min； W---样本质量； D---稀释倍数，未稀释即为 1；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

1 制备标准品母液（1nmol/μL）：向标准品 EP 管里面加入 0.6mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存）。

2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/μL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3 10μL 的标准品+180μL 蒸馏水+10μL 试剂七，混匀 10min 后，于 450nm 处读取吸光值，根据结果即可制作标准曲线。